

51

Int. Cl. 2:

A 61K 31/655

G 01 N 33/16

18 **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

DEUTSCHES PATENTAMT



Behördeneigentum

DT 25 48 196 A 1

11

Offenlegungsschrift 25 48 196

21

Aktenzeichen: P 25 48 196.3

22

Anmeldetag: 28. 10. 75

43

Offenlegungstag: 7. 4. 77

30

Unionspriorität:

32 33 31

24. 9. 75 USA 616451

54

Bezeichnung: Antigene auf Basis von Methaqualon-Hapten sowie deren Verwendung

71

Anmelder: F. Hoffmann-La Roche & Co AG, Basel (Schweiz)

74

Vertreter: Lederer, F., Dipl.-Chem. Dr.; Meyer, R.F., Dipl.-Ing.; Pat.-Anwälte, 8000 München

72

Erfinder: Christenson, James Gordon, Morth Caldwell, N.J. (V.St.A.)

55

**Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:
DT-AS 11 24 504**

DT 25 48 196 A 1

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 11662-003-999
SERIAL NUMBER: 10/647,071
REFERENCE: B03

51

Int. Cl. 2:

A 6 31/655

G 01 N 33/16

19 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Behördeneigentum

DT 25 48 196 A 1

11

Offenlegungsschrift 25 48 196

21

Aktenzeichen: P 25 48 196.3

22

Anmeldetag: 28. 10. 75

43

Offenlegungstag: 7. 4. 77

30

Unionspriorität:

32 33 31

24. 9. 75 USA 616451

54

Bezeichnung: Antigene auf Basis von Methaqualon-Hapten sowie deren Verwendung

71

Anmelder: F. Hoffmann-La Roche & Co AG, Basel (Schweiz)

74

Vertreter: Lederer, F., Dipl.-Chem. Dr.; Meyer, R.F., Dipl.-Ing.; Pat.-Anwälte, 8000 München

72

Erfinder: Christenson, James Gordon, Morth Caldwell, N.J. (V.St.A.)

56

Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:
DT-AS 11 24 504

DT 25 48 196 A 1

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 1) Antigene, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen aus einem Methaqualon-Hapten mit einem Methaqualon-Rest bestehen, der mit seinem TolyI-Ring an ein Brückenglied eines Aminocarbonyl-alkylen-carboxy-, eines niederen Hydroxyalkylen-carboxy- oder eines niederen Alkylen-carboxy-Restes mit 2 bis 7 Kohlenstoffatomen gebunden ist, wobei das Hapten mit der Carboxy-Gruppe des Brückengliedes kovalent an ein immunisierendes Trägermaterial gekoppelt ist.
- 2) Antigene nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Gehalt an Rinderserumalbumin als immunisierendes Trägermaterial.
- 3) Antigene nach den Ansprüchen 1 oder 2, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einem N-Carbonyl-(nieder)alkylen-carboxy-Derivat des 2-Methyl-3-(2-methyl-4-aminophenyl)-3,4-dihydro-4-chinazolins als Hapten.
- 4) Antigene nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Carbonyl-(nieder)alkylen-carboxy-Rest die Succinyl-Gruppe ist.
- 5) Verwendung der Antigene nach den Ansprüchen 1 bis 4 zur Gewinnung von Antikörpern durch Impfen eines Wirtstieres mit den Antigenen, die im wesentlichen aus einem Methaqualon-Hapten mit einem Methaqualon-Rest bestehen, der mit seinem TolyI-Ring an ein Brückenglied eines Aminocarbonyl-alkylen-carboxy-, eines niederen Hydroxyalkylen-carboxy- oder eines niederen Alkylen-carboxy-Restes mit 2 bis 7 Kohlenstoffatomen gebunden ist, wobei das Hapten mit der Carboxy-Gruppe des Brückengliedes kovalent an ein

immunisierendes Trägermaterial gekoppelt ist.

6) Verwendung der Antigene zur Gewinnung von Antikörpern nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Hapten des Antigens ein N-Carbonyl-(nieder)alkylen-carboxy-Derivat des 2-Methyl-3-(2-methyl-4-aminophenyl)-3,4-dihydro-4-chinazolinons ist.

7) Verwendung der Antigene zur Gewinnung von Antikörpern nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Carbonyl-(nieder)alkylen-carboxy-Rest die Succinyl-Gruppe ist.

8) Verfahren zur Untersuchung auf Methaqualon und/oder seine Stoffwechselprodukte in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probe mit einer bekannten Menge eines markierten Methaqualon-Derivats und einem Antikörper, der mit diesem Methaqualon und/oder seinen Stoffwechselprodukten und mit dem markierten Methaqualon-Derivat komplexiert ist, vermischt, den Bindungsgrad dieses markierten Methaqualon-Derivats mit dem Antikörper mißt und die in der Probe vorliegende Menge an Methaqualon und/oder seiner Stoffwechselprodukte durch Vergleich dieses Bindungsgrades mit einer Standardkurve bestimmt, die durch Vermischen bekannter Mengen Methaqualon und/oder seiner Stoffwechselprodukte mit festgesetzten Mengen des markierten Methaqualon-Derivats erhalten worden ist.

9) Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man ein radioaktiv markiertes Methaqualon-Derivat verwendet.

10) Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man ¹²⁵Jed-2-methyl-3-(2-methyl-4-hydroxyphenyl)-4(3H)-chinazolinon

als radioaktiv markiertes Methaqualon-Derivat verwendet.

11) ^{125}Jod -2-methyl-3-(2-methyl-hydroxyphenyl)-4(3H)-chinazolinon als Zwischenprodukt.

12) Methaqualon-Hapten mit einem Methaqualon-Rest, der mit seinem Toly1-Ring an ein Brückenglied eines Aminocarbonyl-alkylen-carboxy-, eines niederen Hydroxyalkylen-carboxy- oder eines niederen Alkylen-carboxy-Restes mit 2 bis 7 Kohlenstoffatomen gebunden ist, als Zwischenprodukt.

13) Hapten nach Anspruch 12, gekennzeichnet durch die Struktur N-3-Methyl-4-(2-methyl-4-oxo-3,4-dihydro-chinazolin-3-yl)-7-phenyl-7-succinamidsäure.

DR. A. VAN DER WERTH
DIPL.-ING. (1934-1974)

DR. FRANZ LEDERER
DIPL.-CHEM.

REINER F. MEYER
DIPL.-ING.

4

8000 MÜNCHEN 80
LUCILE-GRAHN-STRASSE 22

TELEFON: (089) 47 29 47
TELEX: 524 624 LEDER D
TELEGR: LEDERERPATENT

28. Oktober 1975
RAN 4093/10

F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft, Basel / Schweiz

Antigene auf Basis von Methaqualon-Hapten
sowie deren Verwendung.

Methaqualon ist ein Beruhigungs- und Schlafmittel und besitzt die chemische Bezeichnung 2-Methyl-3-o-tolyl-4(3H)-chinazolinon. Es ist im Jahre 1965 in den Vereinigten Staaten von Nordamerika auf den Markt gebracht worden. Wie kürzlich berichtet worden ist, wird mit dieser Verbindung ein erheblicher Mißbrauch getrieben (Smith und Wesson in Ann.Rev.Pharmacol. 14 (1974), 513).

Methaqualon wird offensichtlich sehr stark im Körper abgebaut, so daß nur sehr geringe Mengen unverändertes Methaqualon im Urin aufgefunden werden. Die Stoffwechselprodukte sind größtenteils Glucuronide von monohydroxylierten Derivaten (Bonnichsen und Mit-

709814/1027

arbeiter in Clin.Chim.Acta 40 (1972), 309). Die Hydroxylierung tritt hauptsächlich in den 3- und 4-Stellungen und an der Methylgruppe des Toly-Ringes auf. Offensichtlich ist das Chinazolin-Ringsystem in den Stoffwechselprodukten weitgehend unverändert.

Ein Antigen, das für Methaqualon und seine Stoffwechselprodukte spezifische Antikörper zu erzeugen vermag, wenn es Wirtssäufern injiziert wird, wird in einfacher Weise aus dem bekannten 2-Methyl-3-(2-methyl-4-aminophenyl)-3,4-dihydro-4-chinazolinon unter Bildung eines N-Carbonyl-(nieder)alkylen-carboxy-Analogon von Methaqualon hergestellt. Anschließend wird das Hapten an ein immunisierendes Trägermaterial mittels der Carboxy-Gruppe des Haptens und der reaktionsfähigen Amino- oder Hydroxylgruppen des Trägermaterials kovalent gekoppelt. Außerdem wird ein radioaktiv markiertes Methaqualon-Derivat, das bei der Durchführung einer Untersuchung auf Unempfindlichkeit gegen Bestrahlung wertvoll ist, unter Verwendung des 4-Hydroxy-phenyl-Derivats (ein bekanntes Stoffwechselprodukt des Methaqualons) als Substrat hergestellt.

Gegenstand vorliegender Erfindung sind einmal neue Antigene, die Methaqualon enthalten, das an ein immunisierendes Trägermaterial über ein Carbonyl-(nieder)alkylen-carboxy-Brückenglied gekoppelt ist. Derartige Antigene werden üblicherweise durch Umsetzen der primären Aminogruppe des 4-Aminophenyl-Methaqualonanalogons mit einer niederen Alkylendicarbonsäure oder deren aktivierten funktionellen Derivaten hergestellt, zum Beispiel dem Anhydrid, dem Mono-p-nitrophenyl-ester oder Carbonylhalogenid. Das erhaltene N-Carbonyl-(nieder)alkylen-carboxy-Derivat (Hapten) wird dann

über die freie Carboxy-Gruppe an die freien Amino- oder Hydroxyl-Gruppen des immunisierenden Trägermaterials unter Bildung des gewünschten Antigens kovalent gekoppelt. Auf diese Weise werden die wichtigen entscheidenden als Antigen wirkenden Stellen am Chinazolin-Ringsystem des Methaqualons nicht beeinträchtigt.

Unter dem in der Beschreibung und den Ansprüchen verwendeten Ausdruck "immunisierendes Trägermaterial" wird eine solche Substanz verstanden, die die Eigenschaft besitzt, unabhängig einen immunisierenden Reiz beim Wirtstier hervorzurufen, wenn die Substanz injiziert wird, und die mittels einer kovalenten Bindung an das Methaqualon-Hapten gekoppelt werden kann. Beispiele geeigneter Trägermaterialien sind Proteine, natürliche oder synthetische polymere Verbindungen, wie Polypeptide, zum Beispiel Polylysin, ferner Polysaccharide und dergleichen. Für die Durchführung vorliegender Erfindung ist Protein ein besonders bevorzugtes Trägermaterial.

Die Art des bei der Herstellung des unmittelbaren Antigens eingesetzten Protein-Trägermaterials ist nicht in engen Grenzen kritisch. Beispiele von bevorzugten Proteinen, die bei der Durchführung vorliegender Erfindung wertvoll sind, sind Serumproteine, vorzugsweise solche von Säugern, zum Beispiel γ -Globuline von Menschen und Rindern oder Serumalbumine von Menschen, Rindern und Kaninchen. Andere geeignete Proteine können je nach Empfehlung des Fachmanns eingesetzt werden. Gewöhnlich bevorzugt man die Verwendung von Proteinen, die gegenüber dem Wirtstier fremd sind, in dem das erhaltene Antigen Verwendung findet.

Die erste Stufe bei der Herstellung des Antigens besteht darin, daß man 2-Methyl-3-(2-methyl-4-aminophenyl)-3,4-dihydro-4-chinazolinon mit einer niederen Alkylendicarbonsäure oder deren vorstehend genannten Derivaten umsetzt. Vorzugsweise ist der niedere Alkylrest geradkettig und weist 1 bis 6 Kohlenstoffatome auf. Außerdem wird bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung das Anhydrid der Dicarbonsäure verwendet. Besonders bevorzugt ist Bernsteinsäureanhydrid.

Die Umsetzung zwischen der niederen Alkylendicarbonsäure oder deren Derivat und der 4-Aminophenyl-Verbindung kann in üblicher Weise durchgeführt werden. Zum Beispiel kann Bernsteinsäureanhydrid mit der 4-Aminophenyl-Verbindung in einem organischen Lösungsmittel, wie einem aromatischen Kohlenwasserstoff, zum Beispiel Benzol, Xylol oder Toluol, durch Erhitzen unter Rückfluß zur Erzeugung des N-Succinamidsäure-Derivats umgesetzt werden.

Die Verwendung des Succinamidsäure-Derivats ist bei vorliegender Erfindung besonders zweckmäßig. Andere Mittel zur Einführung der Brückenglieder zwischen den wichtigen entscheidenden Haptenen und dem immunisierenden Trägermaterial sind wohlbekannt. Beispielsweise würde eine Alkylierung des Methaqualons nach Friedel-Crafts mit einem Halogenalkansäureester oder eine Alkylierung eines Alkylmetallsalzes eines phenolischen Methaqualon-Derivats mit einem Halogenalkansäureester nach einer Hydrolyse der Ester Verbindungen liefern, die mit den hier beschriebenen Haptenen vergleichbar sind. Eine andere Alternative besteht in der direkten Synthese des Methaqualon-Haptens aus N-Acetyl-anthranil-

säure und einem Ester eines 4-(nieder)Alkylcarboxy-2-methyl-anilins mit anschließender Esterhydrolyse.

Vorzugsweise besitzen die erfindungsgemäß eingesetzten Brückenglieder 2 bis 7 Kohlenstoffatome ^{in der verbindenden Kette}/. Es ist von Vorteil, daß die Brückenglieder in dem Methaqualon-Molekül den TolyI-Ring in der p-Stellung zum tertiären Stickstoffatom substituieren.

Beispiele von hier als Haptene wertvollen Verbindungen sind 2-Methyl-3-[-2-methyl-4-(2-carboxyäthyl)-phenyl]-3,4-dihydro-4-chinazolinon und 2-Methyl-3-[-2-methyl-4-(2-carboxyäthoxy)-phenyl]-3,4-dihydro-4-chinazolinon.

Demgemäß werden ganz allgemein die Haptene vorliegender Erfindung so betrachtet, daß sie einen Methaqualon-Rest mit einem Brückenglied aufweisen, das an den TolyI-Ring gebunden ist, wobei das Brückenglied aus einem Amino-carbonyl-alkylen-carboxy-, einem niederen Hydroxyalkylen-carboxy- oder einem niederen Alkylen-carboxy-Rest besteht.

Die erhaltenen Haptene können an die immunisierende Trägermaterialien nach beliebigen und verschiedenen an sich bekannten Verfahren gekoppelt werden.

Eines dieser Verfahren sieht die Verwendung eines Kopplungsmittels, wie eines wasserlöslichen Carbodiimids, zum Beispiel 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, vor. Das erhaltene Antigen kann durch Abtrennen von nicht umgesetzten Ausgangssubstanzen und niedermolekularen Nebenprodukten nach üblichen Trennverfahren, wie einer Dialyse, gereinigt werden.

Ein anderes bekanntes Verfahren besteht in der Verwendung eines gemischten Anhydrids. Bei diesem Verfahren werden niedere Trialkylamine, wie Triäthylamin, und niedere Alkylfluorformiate unter Bildung der gewünschten Reaktionslösung mit dem Hapten in einem cyclischen Äther, wie Dioxan, als Lösungsmittel verwendet. Diese Lösung wird dann zu einer wäßrigen Lösung des immunisierenden Trägermaterials gegeben, die ebenfalls einen cyclischen Äther als Lösungsmittel enthalten kann, um die Löslichkeit des aktivierten Haptens zu verbessern. Diese Reaktion wird vorzugsweise bei Temperaturen unterhalb Raumtemperatur, das heißt bei etwa 8°C, durchgeführt. Für diese Reaktion ist ein basischer pH-Wert, wie ein pH-Wert von etwa 9, erwünscht. Das Antigen kann, wie vorstehend angegeben, nach üblichen Verfahren gewonnen werden.

Die Kopplung des Methaqualon-Haptens mittels der Carbodiimid-Methode an Rinderserumalbumin als representatives immunisierendes Trägermaterial hat ergeben, daß etwa 18 bis 25 Moläquivalente auf ein Mol Protein kommen.

Das Antigen vorliegender Erfindung kann dann zur Herbeiführung einer Bildung von für Methaqualon und Methaqualon-Stoffwechselprodukte spezifischen Antikörpern im Serum der Wirtstiere durch Injizieren des Antigens in diese Wirtstiere eingesetzt werden. Das gesammelte Serum kann als solches als methaqualon-spezifisches Antiserum verwendet werden, oder es können gegebenenfalls die Antikörper im Serum noch gereinigt werden, zum Beispiel durch Ausfällen mit einer neutralen Salzlösung mit anschließender Dialyse und Säulen-Chromatographie oder durch andere bekannte

Maßnahmen.

Geeignete Wirtstiere zur Erzeugung von Antiserum gegen Methaqualon sind Säugetiere, wie Kaninchen, Pferde, Ziegen, Meerschweinchen, Ratten, Kühe, Schafe und dergleichen. Die erhaltenen Antikörper besitzen eine Vielzahl von aktiven Stellen, die selektiv mit Methaqualon, mit dem Methaqualon-Antigen vorliegender Erfindung oder mit nahe verwandten Derivaten des Methaqualons, wie den hauptsächlichlichen Stoffwechselprodukten des Methaqualons Komplexe zu bilden vermögen.

Die spezifischen Antikörper vorliegender Erfindung sind wertvoll als Reagentien bei biochemischen Untersuchungen zur Bestimmung des Vorliegens von Methaqualon und seinen Stoffwechselprodukten in biologischen Flüssigkeiten. Ein besonders bevorzugtes Untersuchungsverfahren ist das in der US-PS 3 709 868 beschriebene Unempfindlichkeitsuntersuchungsverfahren. Bevorzugte markierte Methaqualon-Derivate zum Gebrauch bei diesen Unempfindlichkeitsuntersuchungen umfassen die mit Isotopen markierten Methaqualon-Derivate, insbesondere ^{125}Jod -2-methyl-3-(2-methyl-4-hydroxyphenyl)-4(3H)-chinazolinon, sowie solche Methaqualone, die mit einer Elektronenspinresonanzgruppe markiert sind. Beispiele von verschiedenen einsetzbaren mit Elektronenspinresonanzgruppen markierten Molekülen in biologischen Untersuchungen sind in den US-Patentschriften 3 453 288, 3 481 952 und 3 507 876 aufgeführt.

Das Unempfindlichkeitsuntersuchungsverfahren mit radioaktiv markierten Verbindungen wird bevorzugt zur Bestimmung von Methaqualon und seinen Stoffwechselprodukten angewendet. Es ist ein empfindliches, einfaches, schnelles und reproduzierbares Verfahren.

11

Beispiel 1.Herstellung des Antigens.

Zu 100 mg Rinderserumalbumin ("kristallisiert"; $1,47 \times 10^{-6}$ Mol) in 10 ml Wasser werden 29,8 mg (8×10^{-5} Mol) N-[3-Methyl-4-(2-methyl-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin-3-yl)-phenyl]-7-succinamidsäure in 0,5 ml N-Methyl-pyrrolidon gegeben. Die erhaltene Lösung wird mittels 0,1-n Salzsäure oder 0,1-n Natronlauge auf pH 5,5 eingestellt. Zu dieser Lösung werden 15,4 mg (8×10^{-5} Mol) 1-Äthyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid-hydrochlorid auf einmal unter Rühren mit einem magnetischen Rührer zugegeben. Diese Lösung wird 4 Stunden gerührt, währenddessen der pH-Wert mittels 0,1-n Salzsäure zwischen 5,5 und 6,0 gehalten wird. Dann läßt man das Reaktionsgemisch über Nacht bei 4°C stehen und dialysiert über Nacht gegen 1 Liter entsalztes Wasser. Das Dialysat wird dann ausgetauscht, und die Dialyse wird mehrere Stunden fortgesetzt. Das gewünschte Antigen wird aus dem Dialysegefäß gewonnen.

Das Ausmaß einer Kopplung des Haptens bei 2 immunisierenden Präparaten beträgt 18 bis 25 Moläquivalente Methaqualon auf ein Mol Rinderserumalbumin.

Beispiel 2.Immunisierung und Blutentnahme.

Zur Immunisierung von Ziegen wird das dialysierte Antigen des Beispiels 1 mit phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung auf eine Protein-Konzentration von annähernd 2 mg/ml verdünnt. Die verdünnte Antigenlösung wird danach mit dem gleichen Volumen Freund's Adjuvans emulgiert. Die ersten drei Imp-

709814/1027

fungen (unter Verwendung des vollständigen Adjuvans) werden in wöchentlichen Abständen, die vierte nach weiteren drei Wochen und dann in monatlichen Abständen verabreicht (ab der vierten Impfung mit dem unvollständigen Adjuvans). Jede Impfung besteht aus zwei subkutanen Injektionen von jeweils 0,5 ml.

Nach zwei, drei und vier Wochen nach der ersten Impfung wird jeweils Blut entnommen. Nach fünf Wochen und danach in zweiwöchigen Abständen werden 300 ml Blut entnommen. Daraus wird nach Standardverfahren das Serum hergestellt.

Beispiel 3.

N-[3-Methyl-4-(2-methyl-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin-3-yl)-phenyl]-7-succinamidsäure.

In einen mit einer Wasserfalle ausgerüsteten 1-Ltr.-Kolben werden unter Stickstoff 12,0 g (0,045 Mol) 2-Methyl-3-(2-methyl-3-aminophenyl)-3,4-dihydro-4-chinazolinon und 300 ml Benzol gegeben. Nach dreistündigem Erhitzen unter Rückfluß haben sich Spuren Wasser in der Wasserfalle angesammelt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 4,8 g (0,048 Mol) Bernsteinsäureanhydrid zugesetzt, und das Gemisch wird unter Rühren über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen und Filtrieren wird der erhaltene Feststoff mit Benzol gewaschen und unter vermindertem Druck bei 50°C getrocknet. Man erhält 13,1 g eines Feststoffes vom Schmelzpunkt 202,5 - 203,5°C (Zers). Der Feststoff wird danach 30 Minuten bei 60°C in 150 ml Wasser aufgeschlämmt, filtriert, mit wenig Wasser gewaschen und dann unter vermindertem Druck bei 50°C getrocknet. Anschließend wird der Feststoff 40 Minuten in 1 Liter Acetonitril unter Rückfluß erhitzt, auf Raum-

temperatur abkühlen gelassen und filtriert. Man erhält nach dem Trocknen unter vermindertem Druck bei 50°C 9,1 g der in der Überschrift genannten Verbindung vom Fp. 228,5 - 229,5°C. Ausbeute: 55 Prozent der Theorie.

Analyse für $C_{20}H_{19}N_3O_4$:	C	H	N
berechnet:	65,75 %	5,24 %	11,50 %;
gefunden:	65,67 %	5,11 %	11,70 %.

Beispiel 4.

Herstellung eines 125 Jod-markierten Methaqualon-Derivats.

2-Methyl-3-(2-methyl-4-hydroxyphenyl)-4(3H)-chinazolinon wird in Dimethylsulfoxid gelöst, bis eine Konzentration von 2 mg/ml erreicht ist, und dann mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt. Diese Lösung wird dann unter Verwendung von $Na^{125}J$ und dem Natriumsalz des p-Toluolsulfonsäure-chloramins unter üblichen Bedingungen jodiert.

Untersuchungsverfahren.

Das Untersuchungsverfahren ist ähnlich dem, das bei dem "Abuscreen"-Untersuchungsverfahren mit radioaktiv markierten Verbindungen für Morphin angewendet wird. Die für die Untersuchung erforderliche Volumenmenge beträgt 0,1 ml. Für eine quantitative Bewertung werden Standardkurven in rechtwinklig zueinander angeordneten Koordinaten unter Verwendung von 1000, 500, 250, 100, 50, 25 und 10 ng Methaqualon je ml normalem menschlichen Urin vorbereitet.

Durchführung der Untersuchung.

Das Untersuchungsverfahren besteht im allgemeinen aus einem Vermischen einer Probe, die Methaqualon und/oder seine Stoffwechsel-

produkte enthält, mit einer bekannten Menge eines markierten Methaqualon-Derivats und einem methaqualon-selektiven Antikörper, Messen des Bindungsgrades des markierten Methaqualon-Derivats und Bestimmen der Menge des in dieser Probe vorliegenden Methaqualons und/oder seiner Stoffwechselprodukte durch Vergleich dieses Bindungsgrades gegen die Standardkurve, die durch Vermischen bekannter Mengen von Methaqualon und/oder seiner Stoffwechselprodukte mit festgelegten Mengen dieses markierten Methaqualon-Derivats und dieses Antikörpers und Bestimmen des Bindungsgrades für jede bekannte Menge Methaqualon und/oder seiner Stoffwechselprodukte erhalten worden ist. Für die Normierung wird Methaqualon trotz der Tatsache ausgewählt, daß sehr wenig dieses Arzneimittels per se im Urin ausgeschieden wird, und zwar wegen der quantitativen und qualitativen Änderungen bei den Ausscheidungsproben der Stoffwechselprodukte unter den Individuen. Wegen dieser Änderungen ist es unwahrscheinlich, daß die Gültigkeit der Untersuchung durch Auswahl eines Stoffwechselproduktes oder einer bestimmten Kombination von Stoffwechselprodukten für die Normierung verbessert werden könnte. Die auf die genannte Weise erhaltenen Ergebnisse werden als "Methaqualon-Äquivalente" in ng je ml Urin ausgedrückt.

Methaqualon-Standardwerte werden durch Verdünnen einer 1 mg Methaqualon in 1. ml enthaltenden Lösung in 50 % Dimethylsulfoxid auf die erforderliche Konzentration mittels normalen menschlichen Urins hergestellt (die erforderliche Mindestverdünnung ist 2000-fach, so daß die Menge des in den Standardproben vorhandenen Dimethylsulfoxids vernachlässigt werden kann).

Aus der erhaltenen Standardkurve ist ersichtlich, daß die Untersuchung in einfacher Weise die Methaqualon-Mengen in der Größenordnung von 10 ng Methaqualon in 0,1 ml Urin (100 ng/ml) feststellen kann.

Absichtlich wird eine Studie durchgeführt, um die Durchführbarkeit der Methaqualon-Untersuchung unter praxisnahen Bedingungen zu prüfen. Gesunden männlichen und weiblichen Freiwilligen werden oral Einzeldosen von entweder Methaqualon oder eines von fünfzehn Arzneimitteln verabreicht, von denen man annimmt, daß sie aufgrund ihrer chemischen oder pharmakologischen Eigenschaften potentielle Reaktionspartner sein könnten. Die Gesamtmenge des ausgeschiedenen Urins wird fünf Tage lang in verschiedenen Zeitabständen gesammelt. Proben werden auf das Vorhandensein von Methaqualon, seiner Stoffwechselprodukte bzw. der anderen Reaktionspartner untersucht. Die in der Tabelle I angegebenen Ergebnisse zeigen an, daß keine der Urinproben, die vor der Arzneimittelaufnahme oder nach der Einnahme eines anderen Arzneimittels als Methaqualon erhalten worden sind, einen höheren Wert als 39 ng/ml Methaqualon-Äquivalente nennen. Die Urinproben von denjenigen Personen jedoch, die Methaqualon erhalten haben, zeigen einen höheren Wert als 500 ng/ml innerhalb der ersten Stunde nach der Arzneimittelaufnahme an und behalten diesen Wert während der Dauer des Experiments bei.

In der nachstehenden Tabelle I sind die Methaqualon-Äquivalente (ng/ml) im Urin angegeben, der während des angegebenen Zeitintervalls (Stunden) gesammelt worden ist.

TABELLE I

Bei- spiel	Mittel	Dosis (mg)	0	0-1	1-4	4-8	8-12	12-24	24-48	48-72	72-96	96-120
A	Methaqualon	150	7	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
B	Methaqualon	150	39	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
C	Methaqualon	300	8	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
D	Methaqualon	300	5	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
E	Methypylon	300	20	0	20	0	12	10	0	0	0	7
F	Methypylon	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	Aprobarbital	40	11	7	0	0	0	0	0	0	0	0
H	Aprobarbital	40	9	11	0	0	0	0	0	0	0	0
I	Phenobarbital Na-Salz	64	17	0	0	0	0	0	0	1	0	6
J	Phenobarbital Na-Salz	64	0	0	0	0	0	0	0	10	3	11
K	Secobarbital Na-Salz	100	0	0	0	0	0	22	20	16	16	2
L	Secobarbital Na-Salz	100	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0
M	Glutethimid	500	15	0	14	24	24	14	30	32	15	3
N	Glutethimid	500	0	0	0	0	7	11	7	18	26	13
O	Diphenylhydantoin Na-Salz	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	Diphenylhydantoin Na-Salz	100	0	0	0	5	0	0	0	0	2	17
Q	Primidon	250	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0

709814/1027

2548196

TABELLE I (Fortsetzung)

Bei- spiel	Mittel	Dosis (mg)	0-1	1-4	4-8	8-12	12-24	24-48	48-72	72-96	96-120
R	Primidon	250	0	1	0	15	0	0	0	6	3
S	Diazepam	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	Diazepam	10	4	0	0	0	0	0	2	2	0
U	Oxtriphyllin	200	3	0	0	0	0	0	0	4	0
V	Oxtriphyllin	200	1	0	0	0	5	0	4	1	0
W	Coffein-citrat	250	0	0	0	0	0	0	0	0	10
X	Coffein-citrat	250	4	0	1	1	3	10	10	6	5
Y	Thioridazin- Hydrochlorid	25	15	23	4	10	11	11	14	13	11
Z	Thioridazin- Hydrochlorid	25	4	0	8	8	2	6	10	14	14
AA	Chinin-sulfat	325	1	0	0	2	4	0	0	1	0
BB	Chinin-sulfat	325	3	0	3	0	2	1	2	0	0
CC	Imipramin-HCl	25	3	4	4	4	3	1	-	-	-
DD	Imipramin-HCl	25	0	0	0	0	0	0	2	3	0
EE	Phenylbutazon	100	0	0	0	0	1	1	1	0	0
FF	Phenylbutazon	100	0	0	1	3	0	3	1	4	3
GG	Flurazepam-HCl	30	0	0	0	0	0	0	1	1	1
HH	Flurazepam-HCl	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0

709814/1027

ORIGINAL INSPECTED

2548196

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.